

# 果蝇离子通道类似基因 PZL 的克隆与 功能分析

完成人  
丁卓坤

指导小组成员

闫致强 教授

# 目 录

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 摘要 .....                                | 1  |
| Abstract .....                          | 2  |
| 一、前 言 .....                             | 3  |
| 二、材料与amp;方法 .....                       | 5  |
| 2.1 材料 .....                            | 5  |
| 2.2 试剂 .....                            | 5  |
| 2.3 引物 .....                            | 5  |
| 2.4 仪器与设备 .....                         | 6  |
| 2.5 软件及数据库 .....                        | 6  |
| 2.6 实验方法 .....                          | 6  |
| 三、研究结果 .....                            | 9  |
| 3.1 果蝇 PZL 基因序列与 Piezo 蛋白家族序列一致性高 ..... | 9  |
| 3.2 PZL 蛋白于果蝇幼虫听觉神经元中特异性表达 .....        | 11 |
| 3.3 PZL 蛋白敲低的果蝇品系幼虫听力未见明显受损 .....       | 11 |
| 四、讨 论 .....                             | 13 |
| 参考文献 .....                              | 15 |
| 致谢 .....                                | 16 |

# 摘 要

听觉是生物体从外界环境获取信息的重要感觉功能，本研究以果蝇为模式生物探究听觉转导的分子机制。此前研究发现 **Piezo** 家族蛋白具有机械力感受功能，并介导果蝇幼虫的伤害性触觉，但不影响果蝇幼虫的听觉感受。本研究通过分子生物学手段首次获得 **PZL** 基因的完整 cDNA 序列，发现 **PZL** 蛋白与 **Piezo** 家族蛋白序列一致性较高。结合 UAS/Gal4 系统及激光共聚焦显微成像技术发现 **PZL** 基因在果蝇幼虫的听觉神经元中特异性表达。利用基因操作技术及动物行为学手段发现经 RNAi 敲低 **PZL** 基因后，果蝇幼虫对声音刺激的反应无明显变化，从而否定了 **PZL** 基因在听觉转导过程中的可能功能。提示 **PZL** 基因可能参与其余与听觉系统相关的生理活动。

关键词：

果蝇，听觉，**PZL**，**Piezo**

（关键词撰写要求：字号小四，1.5 倍行距，宋体。3-5 个关键词。）

# Abstract

Hearing is an important sensation for animals to obtain information about the environment. Here we studied the molecular transduction mechanism of hearing in *Drosophila*. Recent studies have revealed that Piezo proteins are mechanosensitive and have a role in mechanical nociception, while not engaging in sound perception. In our study, we obtained the complete cDNA sequence of PZL for the first time and found the peptide sequence of PZL highly identical with Piezo proteins. Combining the UAS/Gal4 system and confocal photography, we observed a specific expression of PZL in CHO neurons of *Drosophila* larvae. With transgenic methods and behavioral assays, we found no difference between wild type *Drosophila* and PZL knock-down mutations in response to sound stimuli and thus excluded the possible function of PZL in the molecular transduction of hearing. Our results suggest PZL may have other function in the auditory system.

Keywords,

*Drosophila*, hearing, PZL, Piezo

# 一、前言

听觉是一种特别重要的感觉功能，生物个体从外界获取的信息量很大一部分均来自于听觉，对于人类而言，更是语言发展、语言交流的基础。听觉形成中的一个关键过程是内耳中的机械感受器将声波从机械振动转导为生物电信号。而这一分子转导机制目前仍未被研究清楚。了解这一过程对于认识人类感受环境的方式有巨大的帮助。同时，由于这一分子转导过程牵涉到许多与听力缺陷相关的基因，对这一过程更深刻的认识也能帮助人们认识这些听力缺陷的成因，有助于预防、治疗它们。

果蝇作为一种常用的模式生物，其生活周期较短，基因操作方法十分成熟，可以迅速便捷地进行基因敲除、基因标记等遗传学操作。同时，控制听觉器官发育的关键基因以及编码听觉器官重要组成成分的基因从果蝇到哺乳动物是进化保守的<sup>[1]</sup>。这使得果蝇成为了研究听觉的重要模式生物。不论是用于大规模筛选对听觉形成有重要作用的基因，还是用于进一步研究人类听觉相关基因的具体功能与机理，果蝇与其他模式生物相比，均有极大的优势。因此，本课题选用果蝇作为研究对象，希望对听觉形成过程中的机械力转导过程进行深入研究。课题选用果蝇幼虫而非成虫，原因在于近几年的研究证明果蝇幼虫同样可感受声音，并且果蝇幼虫对于声音刺激有较为明显的反应，便于进行行为学实验<sup>[2]</sup>。

目前，已知有三个 TRP 家族蛋白参与了果蝇幼虫听觉的机械力分子转导过程，分别为 NOMPC，IAV 和 NAN。其中，NOMPC 已被证明是一个机械力门控离子通道，敲除 NOMPC 的果蝇品系对较弱的声音刺激失去反应，但对较强的声音刺激仍有反应<sup>[2] - [4]</sup>。IAV 与 NAN 被认为在体内形成异源二聚体，对听觉的转导过程十分重要，敲除任何一个都会使果蝇对声音完全失去反应，但未有研究证明它们直接参与果蝇听觉的机械力转导过程<sup>[4], [5]</sup>。如上所述，虽然人们已对果蝇听觉的转导过程有了一定的认识，但如果要完全理解果蝇的听觉转导过程，还有许多问题需要解答，如：NOMPC，IAV 和 NAN 在听觉转导过程中各自的作用以及互相之间的关系是怎样的，是否存在除了 NOMPC 以外的机械力门控离子通道参与较强声音的机械力转导过程，是否存在其他重要蛋白参与构成果蝇听觉感受的机械力感受器等等。

在预实验中，我们发现 PZL 蛋白特异性地在果蝇幼虫的听觉神经元中表达。这种特异性的表达形式可能意味着 PZL 的功能与听觉神经元的特殊功能相关。听觉神经元是果蝇幼虫体壁上特化以感受声音刺激的神经元，主要参与声音信号的转导过程，上文提及的 NOMPC，IAV 和 NAN 均表达在听觉神经元中，因而我们猜测 PZL 蛋白很可能直接或间接参与了果蝇幼虫听觉的机械力转导过程，也有可能与 NOMPC，IAV 和 NAN 存在相互作用。而 PZL 蛋白的 cDNA 序列 3' 端仍然未知，功能尚不明，本研究首先通过分子生物学手段获取 PZL 蛋白的 cDNA 全长序列，此后通过基因操作及行为学实验等实验手段进一步了解 PZL 蛋白的表达模式及功能。

## 二、材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 果蝇品系

w<sup>1118</sup>, 62510, 60501, UAS-mCD8-GFP, iav-Gal4: 来自美国印第安纳大学 Bloomington 果蝇中心(Bloomington Stock Center)。

PZL-Gal4: 来自中科院上海生科院生化与细胞所果蝇资源与技术平台

#### 2.2.2 载体与宿主菌

本研究中使用的 pcDNA3.1, 载体骨架均来源于 Addgene。宿主菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技有限公司

### 2.2 试剂

2.2.1 LB 培养基 (胰蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 5g/L, NaCl 10g/L; 用 NaOH 调 Ph 至 7.0。若配制固体培养基, 再加入 15g 琼脂)

2.2.2 TRIzol (Invitrogen)

2.2.3 三氯甲烷 (国药集团化学试剂公司)

2.2.4 异丙醇 (国药集团化学试剂公司)

2.2.5 乙醇 (国药集团化学试剂公司)

2.2.6 TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化科技有限公司)

2.2.7 PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (TaKaRa)

### 2.3 引物

由上海华津生物科技有限公司合成, PAGE 纯化

#### 2.3.1 PZL 1-6481 克隆

PZL 1 FOR: ATGGCCGAGCCTCTATTATTTATTAT

PZL 1 REV 1911: ATCACATTGCAGAGTTGAGTGTAC

PZL 2 FOR 1888: GTACACTCAACTCTGCAATGTGA

PZL 2 REV 3715: TTTTCAATTATGGCAGCTCCCCT

PZL 3 FOR 3369: TTGGAACTGTCTGATTGCTTTTAAT

PZL 3 REV 6481: CATCGTAGTCCTTTATAAAATTTTGC

#### 2.3.2 PZL 3' RACE

QT:

CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTT  
TTTTTT

PZL race 3' 2: TATGGAATATGCCGCCACCTGATAAAGAAC

PZL race 3' 3: GTTTCGCAAAGCAATTCCGACATTCTTCAA

### 2.3.3 PZL pUAST 载体连接

pUAST-PZL 5':

TGAATAGGGAATTGGGAATTCGCCACCATGGCCGAGCCTCTATTATT  
TATTA

pUAST-PZL 3':

GCTCACCATGGTGGCGGTACCAATTCGTTGAATACTTAGCTGGGAA

## 2.4 仪器与设备

### 2.4.1 果蝇 CO<sub>2</sub> 麻醉设备

### 2.4.2 Olympus 体视镜

### 2.4.3 Olympus 激光共聚焦荧光显微镜

### 2.4.4 果蝇幼虫听觉行为学自动筛选设备

## 2.5 软件及数据库

### 2.5.1 Matlab R2016b

### 2.5.2 Flybase: <http://flybase.org>

### 2.5.3 Bloomington Drosophila Stock Center: <http://bdsc.indiana.edu>

### 2.5.4 NCBI BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

## 2.6 实验方法

### 2.6.1 果蝇幼虫总 RNA 提取及 RT PCR

果蝇幼虫总 RNA 提取:

匀浆处理: 取果蝇幼虫 10 只, 于液氮中磨碎, 按 1mg 加 20ul TRIzol 比例加入 TRIzol, 研磨至研钵内匀浆可以流动。将匀浆样品室温静置 5 分钟 4℃ 12000g 离心 10 分钟, 取上清。每使用 1ml TRIzol 加入 0.2ml 三氯甲烷, 剧烈振荡 15 秒, 室温静置 3 分钟。4℃ 12000g 离心 15 分钟,

取无色水相。每使用 1ml TRIzol 加入 0.5ml 异丙醇沉淀水相中的 RNA，室温静置 10 分钟。4℃ 12000g 离心 10 分钟，移去上清，注意不要扰动管底及管侧胶状沉淀。用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀，每使用 1ml TRIzol 加入 1 ml 75%乙醇，4℃ 7500g 离心 5 分钟，移去上清。用 100%乙醇洗涤 RNA 沉淀，每使用 1ml TRIzol 加入 1 ml 100%乙醇，4℃ 7500g 离心 5 分钟，移去上清。室温放置干燥 RNA，加入 25ul RNase-free 水溶解，-80℃保存，取 5ul 跑胶检测 RNA 质量。

RT PCR:

参照 TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒操作步骤。

#### 2.6.2 RACE

按照 TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒，使用 Oligo (dT)<sub>15</sub> 作为引物合成 cDNA 第一链。以 QT 及 PZL RACE 3' 3 为引物，cDNA 第一链为模板做 PCR，取 PCR 反应产物 1ul。以第一次 PCR 反应产物为模板，以 QT 和 PZL RACE 3' 2 为引物做 PCR，跑胶回收所得片段，测序后得到所得片段序列。

#### 2.6.3 基于 UAS/Gal4 系统的 PZL 表达模式观察

杂交 PZL-Gal4 品系果蝇（由 PZL 基因上游 2000bp 增强子序列组织特异地启动 Gal4 蛋白的表达）与 UAS-mCD8-GFP 品系果蝇杂交，杂交第三天去除成虫，待幼虫发育至三龄，取幼虫制水封片，于激光共聚焦显微镜下观察荧光表达模式。

#### 2.6.4 果蝇幼虫听觉行为学实验

取 w1118, 60501, 62510 果蝇三龄幼虫若干于硅胶板上，置于果蝇幼虫听觉行为学自动筛选设备中，通过设备给予 80dB, 500Hz 的声音刺激并记录果蝇幼虫在声音刺激前的移动速度  $V_1$ ，声音刺激后的移动速度  $V_2$ 。通过 t-test 分析果蝇幼虫移动速度在声音刺激前后的变化，判断果蝇幼虫是否对声音有明显反应。通过 t-test 分析突变型果蝇与野生型果蝇的  $V_1$  是否存在显著差别，判断基因突变是否影响果蝇幼虫的行动能力。通过 t-test 分析突变型与野生型果蝇对声音的反应 ( $\frac{V_1-V_2}{V_1}$ ) 是否存在显著差别，以判断基因突变是否影响果蝇幼虫对声音的反应。若突变

型果蝇幼虫行动能力与野生型果蝇没有显著差别，而对声音的反应有显著差别，则判断突变型果蝇幼虫的基因突变会影响果蝇的听觉感知。

### 三、研究结果

#### 3.1 果蝇 PZL 基因序列与 Piezo 蛋白家族序列一致性高

##### 3.1.1 PZL 基因 1-6481 的克隆

为了解 PZL 基因可能的功能，从 cDNA 序列入手进行基因比对寻找一致性高的已知蛋白是常用的手段。由于 PZL 基因在 flybase 数据库中只可查询到部分 cDNA 序列（1-6481），为获得 PZL 全部 cDNA 序列、验证所序列与数据库一致并进行下一步的序列比对，决定对 PZL 基因的全长 cDNA 进行克隆。首先克隆已知的 1-6481 序列片段，由于片段过长，一次克隆全长序列较困难，共分为三段（1-1911，1888-3737，3369-6481）进行克隆。根据序列设计 PCR 引物后，通过 TRIzol 法提取 w1118 品系果蝇幼虫总 RNA，并通过 RT PCR，获得 PZL 基因 1-1911，1888-3737，3369-6481 的 cDNA 序列备用（如图一所示）。

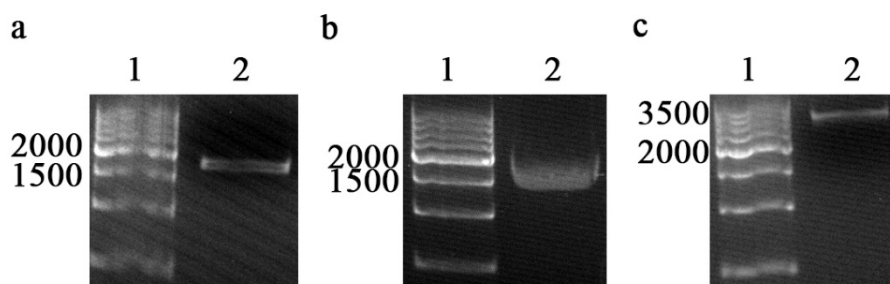


图 1. PZL 基因 cDNA 1-6481 片段的克隆。a: PZL 1-1911 cDNA 片段：泳道 1，DNA Marker，分子量如左所示，泳道 2，PZL 1-1911 cDNA 片段。b: PZL 1888-3737 cDNA 片段：泳道 1，DNA Marker，分子量如左所示，泳道 2，PZL 1888-3737 cDNA 片段。c: PZL 3369-6481 cDNA 片段：泳道 1，DNA Marker，分子量如左所示，泳道 2，PZL 3369-6481 cDNA 片段

##### 3.1.2 PZL 基因 6481-6981 的克隆

由于 PZL 基因 6481 之后的序列未知，选用 RACE（Rapid Amplification of cDNA Ends）方法进行克隆。首先提取果蝇总 RNA，利用 oligo dT 完成 cDNA 第一链合成，之后利用与已知序列 3' 端末尾互补的引物以及与 cDNA 3' 端 polyT 互补的 polyA 引物对 PZL 3' 端未知序列进行克隆，并结合巢式 PCR 方法提高特异性，最终得到 PZL 基因 6191-6981cDNA 片段（如图二所示）。

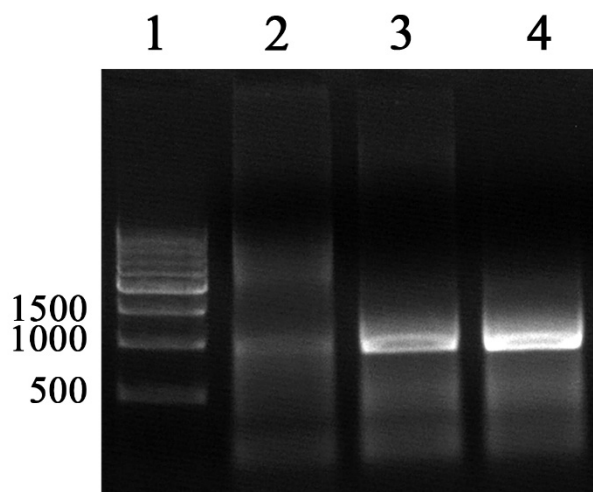


图 2. PZL 基因 cDNA 6191-6981 片段的克隆。泳道 1: DNA Marker, 分子量如左所示, 泳道 2、3、4 均为 cDNA 6191-6981 cDNA 片段, PCR 退火温度分别为 68, 62, 55℃

### 3.1.3 PZL 基因四片段克隆的拼接

得到 PZL 基因 1-1911, 1888-3737, 3369-6481, 6481-6981 四段 cDNA 片段后, 利用四片段间的同源部分, 采用 overlapping PCR 方法拼接所有片段, 得到 PZL 基因的完整 cDNA 片段并连接至 pcDNA3.1 载体测序、保存。

### 3.1.4 PZL 基因与 Piezo 蛋白家族序列一致性高

通过 cDNA 序列, 我们推测了 PZL 蛋白的多肽序列, 并通过 Protein BLAST 工具与数据库中其它蛋白序列进行比对。经比对发现, PZL 蛋白与果蝇 dmPiezo 蛋白序列一致性(Identical)达到 42%, 与小鼠 Piezo1 及 Piezo2 蛋白序列一致性均达到 32%, 与人 Piezo2 蛋白序列一致性达到 32%, 与人 Piezo1 蛋白序列一致性达到 25%。此前, Piezo 家族蛋白已被发现与机械力感受相关, 小鼠与人中的 Piezo 家族蛋白以及果蝇中的 dmPiezo 蛋白均被证实是机械力门控离子通道的成孔亚基<sup>[6], [7]</sup>。而与小鼠与人中存在两种 Piezo 蛋白不同, 果蝇中只发现了一种 Piezo 家族蛋白 dmPiezo, 此次新发现的 PZL 蛋白有可能即是果蝇中的另一个 Piezo 家族蛋白。同时, 与 Piezo 家族蛋白的一致性也说明 PZL 蛋白可能具有与 Piezo 蛋白家族类似的机械门控离子通道的性质。

### 3.2 PZL 蛋白于果蝇幼虫听觉神经元中特异性表达

为进一步了解 PZL 的具体功能，我们决定探究其在果蝇幼虫中的表达模式，由表达模式推测其可能的功能。通过分子克隆及转基因技术，我们构建了转基因果蝇品系 PZL-Gal4，利用 PZL 基因的启动子驱动转录激活蛋白 Gal4。将 PZL-Gal4 品系与 UAS-mCD8-GFP 品系杂交后，PZL 基因启动子驱动下的 Gal4 可与 mCD8-GFP 的上游激活序列 UAS 结合后启动 mCD8-GFP 的表达，从而指导 mCD8-GFP 在有 PZL 蛋白表达的细胞中表达。之后利用激光共聚焦显微成像技术，如图三所示，我们观察到了在果蝇幼虫神经元 vchA/B, lch1 及 lch5 中存在的绿色荧光。而在此前的研究表明 vchA/B, lch1 及 lch5 均为果蝇幼虫中重要的听觉感受神经元<sup>[8]</sup>。由此我们确认了 PZL 蛋白在果蝇幼虫听觉神经元中的特异性表达。该特异性表达说明 PZL 蛋白有可能在幼虫听觉转导过程中有一定功能。

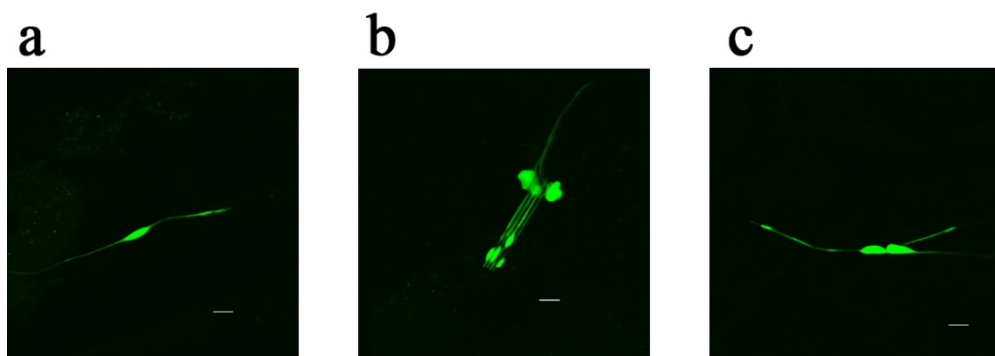
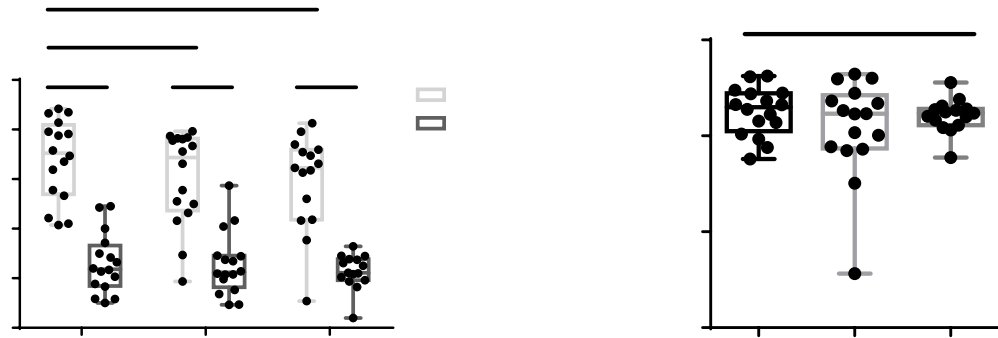


图 3. PZL 的蛋白于果蝇幼虫听觉神经元中特异性表达。a: lch1 细胞；b: lch5 细胞；c: vchA/B 细胞。标尺均为 10 微米。

### 3.3 PZL 蛋白敲低的果蝇品系幼虫听力未见明显受损

为确认 PZL 基因是否与果蝇幼虫听觉转导过程相关，我们从 Bloomington 果蝇中心订购了 PZL RNAi 敲低果蝇品系 60501 及 62510。60501 及 62510 品系均为 UAS-RNAi 品系，且其 siRNA 均靶向 PZL 基因，以降低 PZL 蛋白的表达。首先将 60501 及 62510 品系果蝇与 iav-Gal4 果蝇品系杂交，使靶向 PZL 基因的 siRNA 在听觉感受神经元中特异性表达（iav 启动子为听觉神经元特异性启动子）。通过行为学实验评估其听觉感受能力，经测试，如图四 A 所示，iav-60501 及 iav-62510 品系果蝇与野生型果蝇相比，行动能力均无明显变化，且均对声音刺激有较为明显的反应。如图四 B 所示，iav-60501 及 iav-62510 果蝇品系对声音刺激的反应程度与野

生型果蝇没有显著差别，说明果蝇 PZL 基因在幼虫听觉转导过程中没有重要功能或 PZL 蛋白的功能较为冗余，敲低后的 PZL 蛋白量仍足以完成其生理功能。在课题进行过程中，另一课题组的研究发现小鼠中 Piezo 蛋白在毛细胞中有特异性表达，且 Piezo 蛋白在毛细胞中的敲除同样不影响小鼠听觉，但有证据提示，Piezo 蛋白的敲除可能会对内耳毛细胞的损伤后修复造成影响<sup>[9]</sup>。由此，我们怀疑 PZL 基因在果蝇幼虫听觉神经元中也具有类似作用，但仍需更多实验探究。另外，若要彻底排除 PZL 蛋白在听觉分子转导过程中的作用，还需进行 PZL 的敲除实验，彻底敲除 PZL 蛋白的表达并进行行为学实验。



**图 4. PZL 敲低果蝇品系对声音刺激的反应。** WT: 野生型果蝇，iav-60501 及 iav-62510: PZL RNAi 敲低果蝇品系。A: PZL RNAi 敲低型果蝇的行动能力与野生型果蝇比较无明显变化，且野生型果蝇与 PZL RNAi 敲低型果蝇均对声音有明显反应；B: 野生型果蝇品系与 PZL RNAi 敲低果蝇品系对声音的反应没有显著差别。对声音刺激的反应计算方式为：声音刺激前后的果蝇幼虫爬行速度改变量/声音刺激前的果蝇爬行速度

## 四、讨论

本研究首次通过 RACE 的方法得到了 PZL 基因的 cDNA 完整序列，为今后于体外表达 PZL 蛋白并进一步探究其性质提供了参考，同时发现 PZL 蛋白多肽序列与 Piezo 蛋白家族多肽序列一致性高，提示 PZL 可能是与 Piezo 蛋白家族类似的机械力门控离子通道。此外，本研究利用 UAS/Gal4 系统得到了 PZL 蛋白在果蝇幼虫中的表达模式，发现 PZL 蛋白在果蝇幼虫听觉神经元中特异性表达，该特异的表达模式提示 PZL 蛋白的功能可能与果蝇幼虫的听觉相关。最后利用果蝇幼虫的听觉行为学实验，本研究发现 PZL 蛋白的敲低不影响果蝇幼虫对声音刺激的反应，提出两种可能的解释：极少量 PZL 蛋白即可完成其生理功能或 PZL 蛋白在果蝇幼虫的听觉分子转导过程中没有重要的功能。

在小鼠中 Piezo 家族蛋白 Piezo2 的研究中也有类似的情况发生：虽然 Piezo2 蛋白已被证明是机械力门控离子通道且在轻微触觉中起重要作用<sup>[10]</sup>，并且研究发现 Piezo2 蛋白在内耳外毛细胞基部表达，然而 Piezo2 蛋白的敲除完全不影响小鼠的听觉，而是影响了内耳外毛细胞的反向极化电流（reverse-polarity current）的产生<sup>[9]</sup>。反向极化电流仅存在于发育不完全以及受损伤的外毛细胞中，且其生理意义不明，有研究猜测该电流与毛细胞的修复机制有关<sup>[9]</sup>。PZL 蛋白或许也不直接在听觉转导过程中发挥作用，而是在毛细胞发育或损伤修复过程中起到作用，若要验证该假设，可以尝试进行果蝇幼虫听觉神经元的在体全细胞记录，比较野生型果蝇与突变型果蝇的听觉神经元在接受刺激时电活动的变化，以及听觉神经元受损情况下电活动的变化。另外，利用免疫组化方法观察 PZL 蛋白的亚细胞定位信息也可以进一步提示 PZL 蛋白的功能。

在本研究的基础上，还可以于体外表达 PZL 蛋白进行电生理记录以探究 PZL 蛋白是否具有机械门控型离子通道的相关性质，如是否可通过细胞贴附式记录记录到通道的自发活动，是否可通过机械刺激激活通道开放等。另外，也可尝试观察果蝇成虫中 PZL 蛋白的表达模式，并观察 PZL 敲低的果蝇成虫是否存在行为学异常。

本研究中主要存在 2 个缺陷：首先，利用 UAS/Gal4 系统观察 PZL 蛋白的表达模式事实上是观察了 PZL 上游增强子的表达模式，不能真实地体现 PZL 蛋白的表达模式，并且分辨率仅达到细胞层面，无法了解 PZL 蛋白的亚细胞定

位。若先在体外表达 PZL 蛋白并制作抗体，利用免疫组化方法标记果蝇幼虫中的 PZL 蛋白，则可更真实地反应 PZL 蛋白的表达模式及其亚细胞定位。其次，用于进行听觉行为实验的果蝇品系均为 RNAi 品系，并非完全敲除品系，不能完全抑制 PZL 蛋白的表达，若 PZL 蛋白冗余程度较高，极少量也能完成生理功能，则敲除品系的行为学表型不明显无法说明 PZL 蛋白在听觉转导过程中没有功能。如能利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 PZL 基因，则更加完善。

## 参考文献

- [1] G. Boekhoff-Falk and D. F. Eberl, “The *Drosophila* auditory system,” *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, vol. 3, no. 2, pp. 179–191, Mar. 2014.
- [2] W. Zhang, Z. Yan, L. Y. Jan, and Y. N. Jan, “Sound response mediated by the TRP channels NOMPC, NANCHUNG, and INACTIVE in chordotonal organs of *Drosophila* larvae,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 33, pp. 13612–13617, 2013.
- [3] Z. Yan *et al.*, “*Drosophila* NOMPC is a mechanotransduction channel subunit for gentle-touch sensation,” *Nature*, vol. 493, no. 7431, pp. 221–225, 2013.
- [4] J. T. Albert and M. C. Göpfert, “Hearing in *Drosophila*,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 34, pp. 79–85, Oct. 2015.
- [5] Z. Gong *et al.*, “Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in *Drosophila*,” *J Neurosci*, vol. 24, no. 41, pp. 9059–9066, 2004.
- [6] B. Coste *et al.*, “Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels,” *Nature*, vol. 483, no. 7388, pp. 176–181, 2012.
- [7] S. E. Kim, B. Coste, A. Chadha, B. Cook, and A. Patapoutian, “The role of *Drosophila* Piezo in mechanical nociception,” *Nature*, vol. 483, no. 7388, pp. 209–212, 2012.
- [8] V. Orgogozo and W. B. Grueber, “FlyPNS, a database of the *Drosophila* embryonic and larval peripheral nervous system,” *BMC Dev. Biol.*, vol. 5, 2005.
- [9] Z. Wu *et al.*, “Mechanosensory hair cells express two molecularly distinct mechanotransduction channels,” *Nat. Neurosci.*, vol. 20, no. 1, pp. 24–33, Nov. 2016.
- [10] J. Wu, A. H. Lewis, and J. Grandl, “Touch, Tension, and Transduction – The Function and Regulation of Piezo Ion Channels,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 57–71, 2017.

# 致谢

感谢课题进行全过程中闫致强教授的悉心指导，以及闫致强教授课题组各位硕士生与博士生的帮助，其中特别感谢李松凌师兄、小兰姐对我的实验技术的启蒙指导和耐心教学，李冠鸾师姐在我出国期间接手课题继续推进，孙颖师姐在观察 PZL 蛋白表达模式时的悉心帮助以及论文撰写过程中的指导，章明峰师兄在课题初期的巨大帮助，姚富强师兄和贾岩岩师兄的电生理教学，庄文卉师姐的简明 confocal 教学和不时鞭策。也感谢来自复旦大学生命科学学院拔尖学生培养计划的资金支持。

该课题很不幸地多次遇到挫折而进度停滞不前，并且最终也未能收获阳性的实验结果，但却也锻炼了我解决问题的能力，很感谢闫老师可以给我这样一个珍贵的机会。